

1,2-Dimethylhydrazine 誘発ラット大腸癌の発癌過程における 細胞増殖動態の経時的变化

昭和大学医学部外科学教室 (主任: 草野満夫教授)

横 山 登

大腸癌の発生過程における背景粘膜の細胞動態の経時的变化が癌発生のパラメーターになりうるかについて、1,2-Dimethylhydrazine 誘発ラットを用い、その経時的に施行して得た内視鏡下生検材料を PCNA 標識率, proliferation index (以下, P.I.と略記) にて検討した。PCNA 標識率, P.I. は、肉眼的に確認できる腫瘍発生前より上昇し、対照群より有意に高値であった ($p < 0.05$)。PCNA 陽性細胞は、発癌率が上昇するに従って crypt 底部より表層に移行した。剖検時における発癌群と非発癌群では、発癌群のみに aneuploidy (10.3%) を認め、PCNA 標識率 ($55.3 \pm 12.8\%$) と P.I. ($32.1 \pm 5.5\%$) は非発癌群より有意に高値を示した ($p < 0.05$)。背景粘膜の細胞増殖動態の変化が生検部以外の癌の存在を暗示していると思われた。そして、PCNA 標識率が55%以上, P.I. が30%以上, DNA ploidy pattern が aneuploidy の背景粘膜は、high risk mucosa の状態にあり、これらの変化が癌発生のパラメーターになりうる事が示唆された。

Key words: 1,2-Dimethylhydrazine-induced colon cancer in rat, DNA ploidy, proliferating cell nuclear antigen labeling index

I. はじめに

本邦では近年、食生活の欧米化などに伴い、大腸癌の罹患率は増大傾向にあり、また大腸癌を含め各種臓器癌に対する診断技術や治療成績の向上、ならびに平均寿命の延長に伴い、大腸に発生する2次癌が多く経験されるようになってきた。そして2次癌早期発見の方法開発が期待されているが、現時点では2次癌の危険因子の同定は容易ではないと思われる。一方、遺伝性非ポリポージス大腸癌 (hereditary nonpolyposis colorectal cancer; 以下, HNPCC と略記) は、遺伝学的に DNA ミスマッチ修復酵素の異常であることが Chapella ら¹⁾ および Fishel ら²⁾ によって報告され、分子生物学的研究がすすめられているが、具体的なサーベイランスのプロトコールはいまだ確立されたものはない。

最近、大腸癌患者の非癌大腸粘膜の生化学的变化が注目され^{3)~5)}、大腸癌患者では大腸全体がプロモーターないしは発癌性物質に曝露されていることが示唆されている⁶⁾。非癌大腸粘膜の「細胞増殖動態の変化」

が、大腸癌の存在を示唆するパラメーターとなりうるならば、2次癌や HNPCC の早期発見につながるものと思われる。

この観点より著者は、その発生過程を DMH 誘発ラット大腸癌モデルにて、同一個体での内視鏡下生検材料を用いて、大腸背景粘膜の細胞動態を経時的に観察し、その変化が大腸癌発生のパラメーターになりうるかについて検討した。

II. 対象と方法

1. 大腸腫瘍の作製

実験動物として6週齢の Sprague-Dawley 系雄性ラット (S-D ラット, 日本生物材料センター; 東京) 30匹を用い、角田ら⁹⁾の方法と同様に小動物管理室にて金属性飼育箱に入れ固形肥料 (オリエンタル酵母工業) および飲料水を自由に与え、一定の環境下 (室温 $23 \pm 5^\circ\text{C}$, 湿度 $50 \pm 10\%$) にて飼育した。発癌物質として Dimethylhydrazine (1,2-Dimethylhydrazine dihydrochloride, Aldrich chemical company; 以下, DMH と略記) を用い、20匹は生理食塩水に溶解し 40mg/kg を、残りの10匹は対照群として生理食塩水を 0.2ml , 週1回連続10週、臀部皮下に注射した (Fig. 1)。

2. 大腸内視鏡検査

<1995年12月6日受理>別刷請求先: 横山 登
〒142 品川区旗の台1-5-8 昭和大学医学部外
科学教室

Fig. 1 Experimental schedule

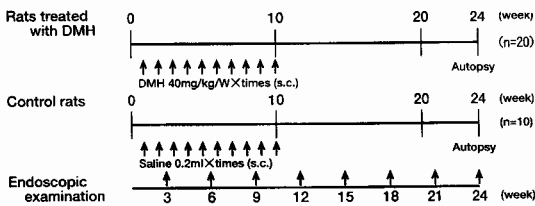
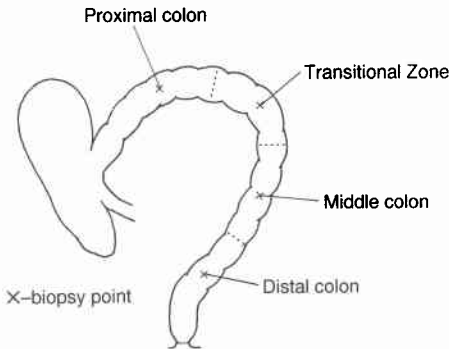


Fig. 2 Classification of the colon in a rat and biopsy points

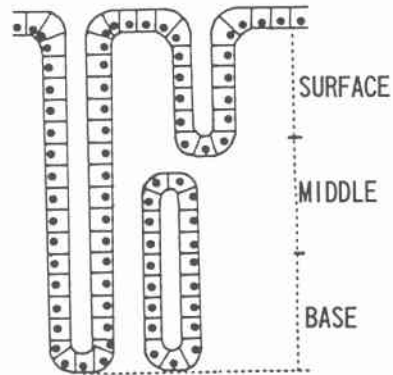


大腸内視鏡検査は、DMH 初回投与後 3 週目より 3 週毎に 24 週目まで計 8 回施行した。前処置は検査前 48 時間を絶食とし、検査 24 時間前に微温湯 5ml で腸洗浄を行った。エーテル麻酔下に気管支ファイバースコープ (オリンパス BF-10) を使用し、送気量を調節しながら全大腸を観察した。なお、通常の観察では見逃しやすい微小病変には散布用カニューレを使用し、0.4% インジゴカルミンを 2 倍希釈して色素散布した。生検部位は肛門縁より 5cm (遠位大腸), 10cm (中位大腸), 15cm (移行部), 20cm (近位大腸) の 4 カ所とした (Fig. 2)。初回生検後の 24 時間後にエーテル麻酔下にて開腹し、生検部位に 5-0 Prolene を用いて、管腔内に糸が露出しないようにマーキングを施行し、同一部位での生検を可能とし経時的変化を観察した。また、DMH 投与開始後 24 週目の内視鏡検査終了後、すべての実験動物を屠殺し大腸を摘出、エタノール固定して、Hematoxylin Eosine (H.E.) 染色にて病理組織学的に検討した。

3. Proliferating cell nuclear antigen (増殖細胞核抗原: 以下、PCNA と略記) 標識率

内視鏡施行下にて得た生検組織を 70% エタノールで固定し、ストレプトアビジン-ビオチン (SAB) 法で PCNA 抗体 (Oncogene Science) を反応させ、3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (SIGMA) で

Fig. 3 Classification of the crypt



発色させ、光学顕微鏡 (×400) で原則として 1,000 個以上の核を数えた。これに対する PCNA 陽性核の割合を百分率で示したものを PCNA 標識率とした。また、粘膜表層部から腺管上皮の下限までを表層、中間層、基底層に 3 等分し、PCNA 標識率を部位別、腺管区分別に経時的に検討した (Fig. 3)。

4. DNA 量の測定

生検組織は、クエン酸緩衝液にて -70°C で保存した。フローサイトメトリー (以下、FCM と略記) で解析した検体は、中尾⁷⁾の方法と同様にホモジネーターを用いて分散を行ない、トリプシンにて裸核後 4°C 15 分間 0.25mg/ml RNase 液 (SIGMA) で 1 回洗浄し、38µm nylon mesh で濾過後、propidium iodide 液を 1ml 加え染色した。FCM は、FACScan (Becton Dickinson 社) を用い、1 検体約 10,000 個の細胞核について DNA 量を測定した。解析は Cell Quest ソフトウェア (Becton Deckinson 社) を用い、① DNA index (以下、D.I. と略記。D.I. は、2 つの G₀/G₁ peak の channel 数の比とし、3 つ以上の G₀/G₁ peak を有する polyploidy の場合は最も多くの細胞からなる G₀/G₁ peak の channel 数の比とした。), ② DNA ploidy pattern (histogram 上 G₀/G₁ peak が 1 つのものを diploidy とし、2 つ以上の明らかな G₀/G₁ peak を有するものを aneuploidy とした。), ③ proliferation index (P. I. = S + G₂M / (G₀G₁ + S + G₂M)) の 3 種類の判定方法で検討した。

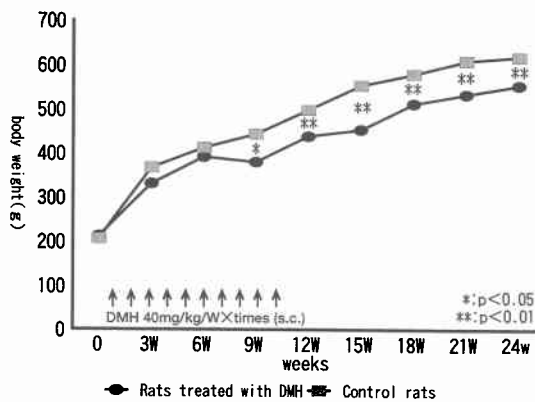
なお有意差検定には、Wilcoxon 検定を用い危険率 5% 未満を有意の差ありとした。

III. 結 果

1. 実験動物の経過

24 週の内視鏡検査終了後の屠殺時まで生存したラッ

Fig. 4 Changes of body weight



トは、DMH 投与群では17匹、対照群では8匹であった。途中死亡したラット5匹の死亡原因は、すべて内視鏡検査時の生検による消化管穿孔に伴う腹膜炎であった。

DMH 投与群と対照群では投与期間中の増加率は明らかに対照群より低かった。また、24週目の平均体重はDMH 投与群では 553 ± 54 gと、対照群の 617 ± 42 gと比すると著しく少なく、有意の差を認めた (Fig. 4)。

2. 内視鏡的所見

ラットの大腸は、屈曲が少なく近位大腸まで挿入は容易であった。大腸管腔は送気により十分に伸展され、良好な観察視野が得られた。大腸粘膜は桃白色を呈し、毛細血管網は明瞭に透見され、ヒト大腸粘膜と類似していた。

初回内視鏡検査終了後に5-0 Prolene にてマーキン

グした部位は、2回目以降の検査時には薄い青色に透見され、ラットの成長に伴って腸管の長さが長くなって同一部位での生検が可能であった。

また、腫瘍径を生検鉗子の太さと比較して、5mm以下、5mm~10mm、10mm以上の3つに区別し、腫瘍の形態を小隆起型、扁平隆起型、ドーム型、中央陥凹型の4型に分類して、その変化を観察した。内視鏡的に観察される5mm以下の腫瘍は、大部分が小隆起または扁平隆起型であった。そして多くの場合小隆起型から扁平隆起型、ドーム型へ移行する傾向が認められ、21週目では扁平型が20病変(41.7%)、ドーム型が16病変(33.3%)であった (Fig. 5)。これらの腫瘍の経時的発生状況を見るとDMH 投与開始後12週目に17匹中3匹(5病変, 17.7%)の発生が認められた。そして15週目には6匹(12病変, 35.5%)、18週目には10匹(26病変, 58.8%)と増加した。その後も週齢を重ねるにつれて、腫瘍数、発生率は共に増加し、24週目には14匹(57病変, 82.4%)に腫瘍が認められた (Fig. 6)。

3. PCNA 標識率

3週毎に内視鏡検査を施行してえた生検組織を用いて、大腸背景粘膜における細胞増殖帯の変化をPCNA 標識率にて示した。

(1) PCNA 標識率の部位別経時的推移

PCNA 標識率は、3週目にはDMH 投与群で $32.2 \pm 2.1\%$ 、対照群で $36.9 \pm 2.8\%$ とともに高い標識率を示したが、部位別には有意の差を認めず、その後は低下傾向を示した。しかし、DMH 投与群では9週目で $21.6 \pm 1.7\%$ と最低値となったが、腫瘍発生前より再び上昇傾向を示し、12週目では $29.9 \pm 2.8\%$ と対照群の

Fig. 5 Endoscopic pictures showing a representative course of colonic carcinoma

a. Small elevation type (12w), b. Flat elevation type (18w), c. Dome type (21w)

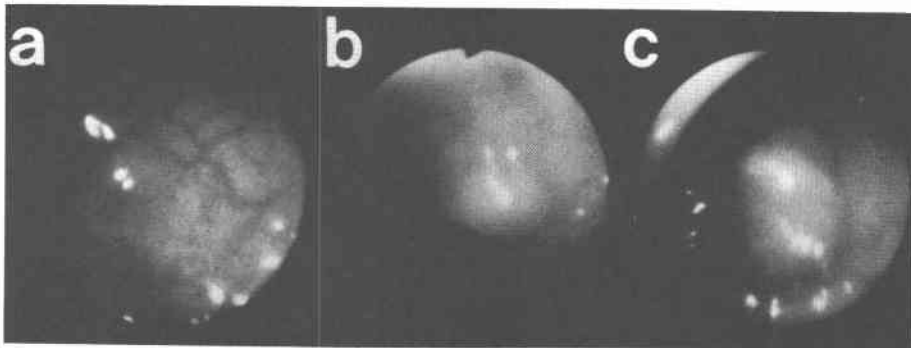


Fig. 6 The number and the size of colonic tumors discovered by serial colonoscopic examination

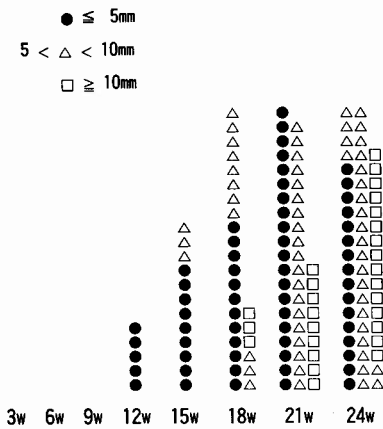
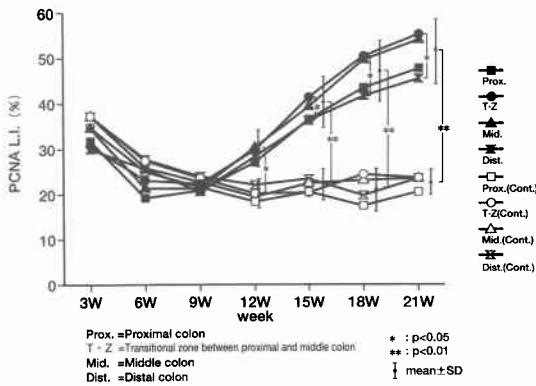


Fig. 7 Changes of PCNA labeling index with experimental period



20.2±1.6%より有意に高い標識率を示した。また、移行部と中位大腸間、近位大腸と遠位大腸間には、統計学上有意の差は認めず、移行部と遠位大腸を比較すると、移行部において12週目より高い標識率を示し、15週目では移行部で42.2±4.6%、遠位大腸で31.8±3.8%と統計学的有意の差を認めた。対照群では、15週以降横ばい状態となり、部位別の標識率の差は認めなかった (Fig. 7)。

(2) 腺管区分別のPCNA 標識率

腫瘍の好発部位である移行部の標識率を3週、9週、21週目で比較してみると、DMH 投与群では3週目に標識率は基底層で39.8±6.7と有意に高値を示し、21週目には細胞増殖帯は表層に移行し、表層(52.3±8.9%)と基底層(20.4±5.5%)間には統計学的有意差を認めた。対照群では細胞増殖帯の移行は認めなかった (Fig. 8, 9)。

4. DNA 量の測定

FCMにて解析可能であった検体は、全生検数690個中542個(78.6%)であった。

DMH 投与群で背景粘膜のDNA ploidy patternをみると、aneuploidyは、有効生検数の10.2%(373例中38例)にみられ、比較的早期に腫瘍発生が観察されたラットの移行部、中位大腸にのみ認められ、D.I.は1.37±0.31、coefficient of variation(以下、CVと略記)は5.3±1.28%であった。また、diploidyを示した大腸粘膜は89.8%で、D.I.は1.00±0.03、CVは4.6±1.75%であった。

対照群はすべてdiploidy patternを示し、D.I.は

Fig. 8 PCNA labeling index of classification of the crypt with each period (a. 3 week, b. 9 week, c. 21 week) in the transitional zone between proximal and middle colon

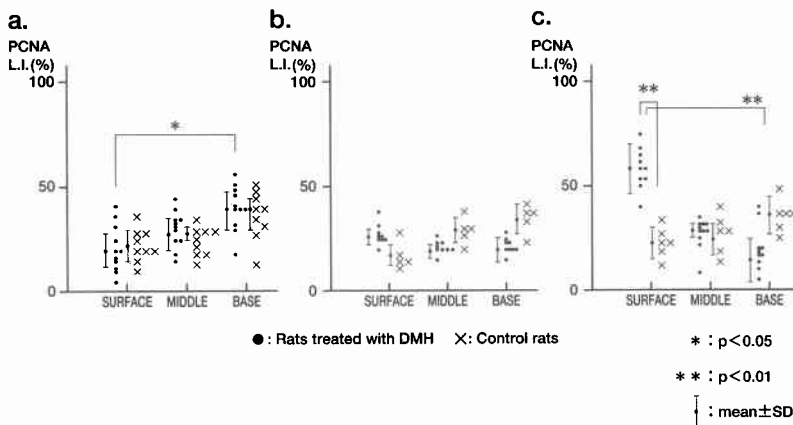


Fig. 9 PCNA labeling index ($\times 200$) a. 34.8% (3w), b. 50.4% (21w) Proliferative zone moved from the base to the surface with experimental period.

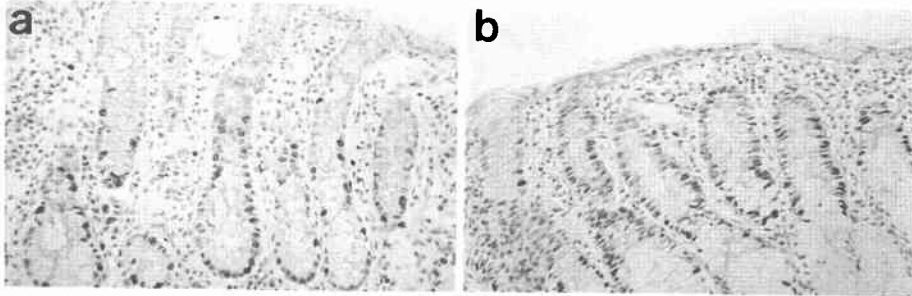


Fig. 10 DNA Histogram

a. diploidy pattern (CV=3.7, D.I.=1.0, P.I.=21), b. aneuploidy pattern (CV=4.2, D.I.=1.2, P.I.=31)

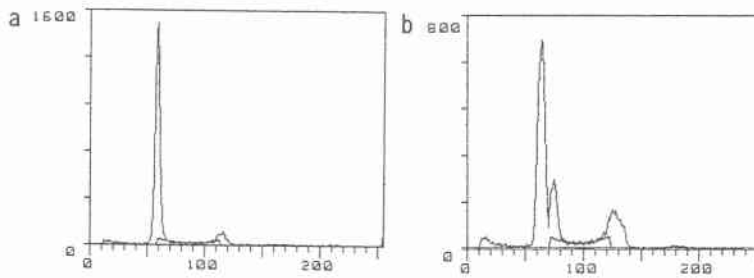


Table 1 Classification of DNA ploidy pattern

Rats treated with DMH	aneuploidy	diploidy
Number of Biopsy Specimens (373/476)	38 (10.2%)	335 (89.8%)
D.I.	1.37 \pm 0.31	1.00 \pm 0.03
CV	5.3 \pm 1.28	4.6 \pm 1.75

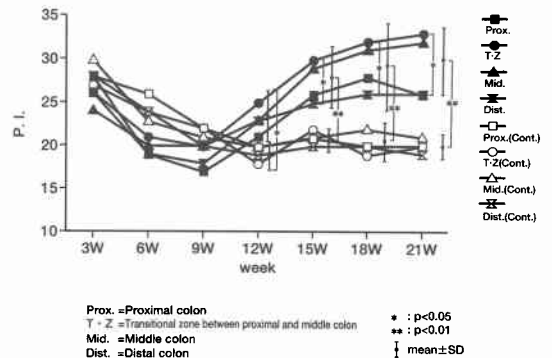
1.00 \pm 0.02, CVは4.2 \pm 1.69であった (Table 1, Fig. 10).

組織細胞増殖度を求めるP.I.の経時的推移を部位別に比較すると、P.I.の変化は、PCNA標識率と同様のpatternを示した (Fig. 11).

5. 肉眼像および病理組織像

DMH投与群の有効動物17匹において、屠殺時肉眼的に観察できた大腸腫瘍は64個であった。担腫瘍動物は14匹82.4%で、1匹当りの腫瘍発生数は4.9 \pm 3.1病変であった。好発部位は移行部(40.6%)、次いで中位大腸(31.3%)、近位大腸、遠位大腸の順であった。なお、対照群には腫瘍発生を認めなかった (Table 2).

Fig. 11 Changes of P.I. with experimental period



病理組織学的には、大腸腫瘍64個中癌は60病変93.8%と大部分を占め、腺腫は4病変6.3%と少なかった。癌の組織型は高分化腺癌46個(76.7%)、中分化腺癌7個(11.7%)が大部分であったが、粘液癌、印環細胞癌も少数認められた。

6. PCNA標識率・P.I.と癌の発生率

DMH投与開始後9週目の腫瘍の発生を認めない時

Table 2 The number of occurrence of colonic tumors in different portions of the colon

	Proximal colon	Transitional zone	Middle colon	Distal colon	
Rats treated with DMH (N=14)	10 (15.6%)	26 (40.6%)	20 (31.3%)	8 (12.5%)	64
Control rats (n=8)	0	0	0	0	0

Table 3 PCNA LI, P.I. and relationship of occurrence of colonic cancers

	9w	12w	15w	18w	21w
PCNA L.I. (%)	21.6±4.8	29.9±2.8	35.6±4.8	43.6±4.1	47.9±5.6
P.I. (%)	19.4±3.2	24.3±2.6	26.7±2.4	28.1±3.1	29.4±3.3
Relationship of occurrence of tumors	0% (0/17)	17.7% (3/17)	35.3% (6/17)	58.8% (10/17)	82.4% (14/17)

期では、PCNA 標識率22%、P.I. 19%と低値であったが、12週目の腫瘍発生時では、PCNA 標識率30%、P.I. 24%で17匹中3匹 (17.7%) に腫瘍が発生していた。その後、PCNA 標識率、P.I.、腫瘍発生率はともに増加し、21週時には PCNA 標識率48%、P.I. 29%、腫瘍発生率82.4%となった (Table 3)。

7. 剖検時における発癌群と非発癌群の背景粘膜の細胞増殖動態の比較

DMH 投与群で屠殺時に大腸に発癌を認めた群と認めなかった群とに分け、12週以降の背景粘膜の細胞動態を比較した。発癌を認めたラットは14匹 (82.4%)、認めなかったのは3匹 (17.6%)であった。aneuploidy は発癌群にのみ認められた。発癌群では、PCNA 標識率は

55.3±12.8%、P.I. は31.2±5.5%と非発癌群の30.1±10.4%、25.4±6.9%に比べても有意に高値を示した (Table 4)。

IV. 考察

大腸癌患者の非癌大腸粘膜の生化学的変化として Polyamine 含有量ならびに Ornithine decarboxylase (以下、ODC と略記)活性は正常対照粘膜に比べて高値を示すことが報告されており³⁾⁻⁵⁾、大腸癌患者では大腸全体がプロモーターや発癌性物質に曝露されていることを示唆している。一方、ラット実験大腸癌において、担癌ラットの非癌粘膜中の ODC 活性、Polyamine 値は正常対照粘膜より亢進し、大腸癌患者のモデルに利用可能と報告されている⁸⁾⁹⁾。本研究では、大腸化学発癌ラットを用いて内視鏡検査を行い、経時的に大腸粘膜の変化を観察し、大腸粘膜の細胞増殖動態を PCNA 標識率と P.I. で表示することにより、背景粘膜の変化をとらえ、腫瘍発生時期や大腸癌の早期発見につながるパラメーターになりうるかどうか検討した。

本研究では、大腸化学発癌ラット (DMH 投与群) と対照ラットの2群に分けて経時的観察を行ったが、両群における平均体重をみると DMH 投与群は対照群と比較して、DMH 投与後9週 (15週齢) から有意に低値であった。これは DMH 投与群で大腸癌の発生と経時的な多発化およびそれらの増大に伴うホストの栄養障害がその原因と思われる。

近年発癌物質の開発によって実験大腸癌を用いた研究が広く行われ、発癌物質投与後の経時的屠殺¹⁰⁾⁻¹⁴⁾ という方法がとられてきた。しかし、これらの方法ではある時点の腫瘍発生状況と細胞増殖帯の変化を観察できるが、同一個体での腫瘍発生時期、発育速度、背景粘膜の増殖の変化などの時間的要素を観察することはできない。1975年、Narisawa ら¹⁵⁾がラット実験大腸癌

Table 4 Differences in cell proliferation of colonic mucosa between rats with and without cancer

		Numer of RAT	DNA ploidy pattern		PCNA L.I. (%)	P.I. (%)
			aneuploidy	diploidy		
Rats treated with DMH (n=17)	cancer (+)	14 (82.4%)	38 (10.3%)	264 (70.8%)	55.3±12.8	31.2±5.5
	cancer (-)	3 (17.6%)	0	109 (29.2%)	30.1±10.4	25.4±6.9
Control rats (n=8)		8	0	132 (100%)	22.3±7.4	20.1±4.8

*p<0.05
**p<0.01

の検索に内視鏡検査をとりいれて以来、この方法による実験大腸癌の発癌過程に関する報告も散見されるようになってきた。金城¹⁶⁾、吉田¹⁷⁾は、経時的内視鏡検査により腫瘍の形態学的変化と進展様式を詳細に比べ、大腸癌の自然史の解明に有用であると報告している。しかしながら、大腸癌の発生過程をみるためには、発生した癌よりもその発生母地としての背景粘膜の細胞増殖動態がより重要と考えられる。この観点で行った実験の報告は著者の調べ得た限りではみられず、本研究では細胞増殖関連物質である PCNA の免疫染色を行い、また細胞核内の DNA 量の変動を FCM にて解析した。

PCNA は DNA ポリメラーゼ δ の補助因子として機能している 36kD の分子量を持つ非ヒストン蛋白であり、細胞周期では G₁ 後期から S 期にかけて核内に出現し、細胞増殖の初期段階において重要な役割を演じているといわれている^{18)~20)}。FCM は簡便かつ迅速に細胞内の DNA 量を測定することができ、この DNA ヒストグラムから S 期細胞の分画算出、合成速度の測定などの解析方法が報告されてきた^{21)~24)}。S 期細胞の分画算出には種々の数学的モデルであるが、今津ら²⁵⁾は、Dean 法が最も感受性が高いことを報告している。著者も Dean 法にて P.I. を算出した。今回、FCM にて解析可能であった検体は 78.6% と低く、その原因は生検組織の量が微量であったことと、生検が不確実に行われたためと考えられた。

このようにして求めた PCNA 標識率の経時的変化をみると、両群共に皮下注射開始後 3 週 (9 週齢) において高値なのは成長による高い細胞増殖率を示していると思われる。DMH 投与群にて皮下注後 12 週以降対照群と比べて高値であるのは背景粘膜の異常な細胞増殖を現しており、前癌状態にあることを示唆すると考えられた。ラット大腸の部位別による PCNA 標識率の変化では、移行部と中位大腸で高値を示している。このことは、従来教室で行っている発癌実験⁶⁾⁷⁾²⁶⁾で移行部における癌の発癌頻度が遠位より高かったことを裏付ける結果であり、DMH 投与により移行部と遠位間での細胞増殖動態の変化に差があることを明らかにした著者の研究は、腫瘍発生上に差異を認める原因の一つとして重要であると考えられた。腺管区分別の PCNA 標識率をみると、DMH 投与群で 21 週目に細胞増殖帯が表層に移行したが、同様の結果を川村¹³⁾、Kimura ら²⁷⁾も報告している。ヒト大腸癌においても、Lipkin²⁸⁾、Deschner ら²⁹⁾³⁰⁾、Cole ら³¹⁾が、細胞動態の

研究から増殖帯の粘膜表層への拡大や逆転が起こって、それが腫瘍化すると述べている。

PCNA 標識率および P.I. の経時的変化と各時期における癌の発生率は DMH 投与後の週数に対応して増大する傾向を認めた。同一ホストでみると、背景粘膜の PCNA 標識率と P.I. が高いラットは生検部位以外の大腸に癌が発生している可能性が大きいと考えられた。剖検時における発癌群と非発癌群の比較では、発癌群のみに aneuploidy を認め、PCNA 標識率と P.I. ともに有意に高値を示した。背景粘膜の細胞増殖動態の変化が生検部位以外の癌の存在を示唆していると思われた。そして、PCNA 標識率が 55% 以上、P.I. が 30% 以上、DNA ploidy pattern が aneuploidy の背景粘膜は、high risk mucosa の状態にあり、これらの変化が癌発生のパラメーターになりうるということが示唆された。ヒト大腸癌においても Lipkin³²⁾は H³-Thymidine を用いて大腸癌高危険群における直腸粘膜の生検材料を用いて検討し増殖細胞の増加と増殖帯の拡大がみられると報告している。実験大腸癌では比較的短期間に大量の発癌物質を投与するので、腫瘍が多発し、その背景粘膜での細胞動態はヒト大腸癌の場合と同一視できないが、本研究で用いた PCNA 標識率と P.I. をヒトの直腸粘膜生検に応用することで 2 次癌や HNPCC の早期発見につながる可能性があると思われた。

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜った草野満夫教授、また直接御指導、御教示を頂いた渋澤三喜助教授、ならびに角田明良博士、中尾健太郎博士に深謝致します。さらに限らない御援助を頂きました昭和大学医学部臨床病理学教室の福地邦彦講師、昭和大学医学部外科学教室研究室の皆様深く御礼申し上げます。

なお、本論文の要旨は第 46 回日本消化器外科学会総会、第 7 回日本消化器癌発生研究会で発表し、またその一部を第 54 回日本癌学会総会にて発表した。

文 献

- 1) Chapella A, Peltomaki P, Aaltonen LA et al: Genetic mapping of a locus predisposing to human colorectal cancer. *Science* 260: 810-812, 1993
- 2) Fishel P, Lescoe MK, Rao MRS et al: The human mutator gene homolog MSH 2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 75: 1027-1038, 1993
- 3) LaMuraglia GM, Lacaine F, Malt RA: High ornithine decarboxylase activity and polyamine levels in human colorectal neoplasia. *Ann Surg*

- 204 : 89—93, 1086
- 4) Rozhin J, Wilson PS, Bull AW et al: Ornithine decarboxylase activity in the rat and human colon. *Cancer Res* 44 : 3226—3230, 1984
 - 5) Narisawa T, Takahashi M, Niwa M et al: Increased mucosal ornithine decarboxylase activity in large bowel with multiple tumor, adenocarcinoma, and adenoma. *Cancer* 63 : 1572—1576, 1989
 - 6) 角田明良, 渋澤三喜, 滝本雅文: ラットを用いた DMH 誘発実験大腸癌の増大速度. *日外会誌* 91 : 581—587, 1990
 - 7) 中尾健太郎: 1,2-Dimethylhydrazine 誘発ラット大腸癌増殖における脾臓摘出の影響. *日消外会誌* 28 : 17—24, 1995
 - 8) Gordon DL, Stanley RH, Peter Y et al: Kinetic change in mucosal ornithine decarboxylase activity during Azoxy-methane-induced colonic carcinogenesis in rat. *Cancer Res* 46 : 4449—4452, 1986
 - 9) 角田明良, 渋澤三喜, 吉沢太人ほか: 1,2-Dimethylhydrazine (DMH)誘発ラット大腸癌モデルにおける非癌粘膜および癌組織中 Polyamine 値の検討. *日消病会誌* 88 : 1060—1065, 1991
 - 10) 三芳 端, 大原 毅, 森岡幹登: 1,2-Dimethylhydrazine 誘発ラット大腸癌の組織発生および進展に関する研究. *日消病会誌* 75 : 284—293, 1978
 - 11) 瀬野尾一孝, 喜納 勇, 友成久世: MNU 誘発ラット大腸癌の発生様式に関する研究. *日本大腸肛門病会誌* 44 : 1019—1024, 1991
 - 12) 蒔田富士雄: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine によるラット消化管(胃・上部小腸)の発癌過程における細胞動態に関する研究. *日消外会誌* 24 : 1179—1186, 1991
 - 13) 川村慶三: DMH 投与によるラット大腸癌とその周辺および背景粘膜の病変に関する研究. *日本大腸肛門病会誌* 37 : 714—724, 1984
 - 14) 矢部正治: N,N'-Dimethylhydrazine Dihydrochloride (DMH)投与によるラット大腸粘膜増殖帯の変化と大腸腺腫発生. *日本大腸肛門病会誌* 38 : 696—706, 1985
 - 15) Narisawa T, Wong CQ, Weisbutger JH: Evaluation of endoscopic examination of colon tumors in rats. *Dig Dis* 20 : 928—934, 1975
 - 16) 金城福則: N-ethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)による実験的大腸隆起性病変の内視鏡学的研究. *Gastroenterol Endosc* 22 : 193—197, 1980
 - 17) 吉田 司: N-methyl-N-nitrosourea 誘発ラット大腸癌の進展過程. *Gastroenterol Endosc* 26 : 1009—1024, 1984
 - 18) Bravo R, Frank R, Blundell PA et al: PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase- δ . *Nature* 326 : 515—517, 1987
 - 19) 西村和彦, 細川洋平, 藤本荘太郎ほか: PCNA 免疫組織科学によるヒト大腸腫瘍の進展に伴う細胞増殖と増殖の場の変化の検討. *日消外会誌* 90 : 647—654, 1993
 - 20) 田中一成, 田村賀子, 柳井秀雄ほか: 大腸の各種病変における proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cylin)陽性細胞の組織学的検討. *日消外会誌* 89 : 493—497, 1992
 - 21) Kawamoto K, Herz F, Wolley RC et al: Flow cytometric analysis of the DNA distribution in human brain tumors. *Acta Neuropathol* 46 : 39—45, 1979
 - 22) Barlogie B, Drewink B, Johnston DA: Pulse cytophotometric analysis of synchronized cells in vitro. *Cancer Res* 36 : 1176—1178, 1976
 - 23) Dean PN, Gray JW, Dolbeare FK: The analysis and interpretation of DNA distribution measured by flow cytometry. *Cytometry* 3 : 188—195, 1982
 - 24) Baisch H: A comparison of mathematical methods for the analysis of DNA histograms obtained by flow cytometry. *Cell Tissue Kinet* 15 : 235—249, 1982
 - 25) 今津浩喜, 笠原正男, 城野健児ほか: フローサイトメトリーにおける細胞増殖能に関する判定基準の基礎的解析—核 DNA Histogram による各種解析法の比較検討—. *藤田学園医会誌* 16 : 89—94, 1992
 - 26) 保田尚邦: 注腸 X 線検査からみたラット実験大腸癌モデルに対する OK-432 経口投与の腫瘍増殖抑制効果について. *日本大腸肛門病会誌* 46 : 169—174, 1993
 - 27) Kimura O, Kaibara N, Miyano Y et al: Nuclear DNA content in Dimethylhydrazine induced colonic carcinoma and mucosal dysplasia in rat. *Cancer* 53 : 1918—1922, 1984
 - 28) Lipkin M: Phase 1 and phase 2 proliferative lesions leading to colonic cancer. *Cancer* 34 : 878—888, 1974
 - 29) Deschner EE, Lipkin M: Proliferation and differentiation of gastrointestinal cells in health and disease. Edited by Lipkin M, Good RA. *Gastrointestinal tract cancer*. Pleum Medical Book Co, New York, 1978, p3—27
 - 30) Deschner EE, Lipkin M, Solomon C et al: Study of human rectal epithelial cells in vitro. H³-Thymidine incorporation into polyps and adjacent mucosa. *J Natl Cancer Inst* 36 : 849—

857, 1966

- 31) Cole JW, Mckalen A: Studies on the morphogenesis of adenomatous polyps in the human colon. *Cancer* 16: 998-1002, 1963

- 32) Lipkin M: Biomarkers of increased susceptibility to gastrointestinal cancer: new application to studies of cancer prevention in human subjects. *Cancer Res* 48: 235-245, 1988

Chronological Changes in Cell Proliferation of Colonic Mucosa in Dimethylhydrazine-induced Colon Carcinogenesis in Rat

Noboru Yokoyama

Department of Surgery, Showa University School of Medicine
(Director: Prof. Mitsuo Kusano)

Chronological changes in proliferation of colonic mucosal cells in dimethylhydrazine (DMH)-induced colon carcinogenesis were investigated by using biopsy specimens obtained by serial colonoscopy. The proliferating cell nuclear antigen (PCNA)-labeling index and the proliferation index (P.I.) of colonic mucosa in DMH-treated rats were significantly higher than those in control rats from 12 weeks after the beginning of carcinogen injection until the end of the experiment. PCNA-stained cells in the crypt of the mucosa in DMH-treated rats moved from the base of the surface with increasing incidence of colon tumors, compared with the control rats. At necropsy, aneuploidy of the mucosa was discovered only in rats with tumors. The PCNA-labeling index ($55.3 \pm 12.8\%$) and P.I. ($31.2 \pm 5.5\%$) in rats with tumors were significantly higher than those in rats without tumors. These proliferative changes in the mucosa, suggesting that it became a high risk mucosa, imply that these changes may become the parameters for detecting colon cancer.

Reprint requests: Noboru Yokoyama Department of Surgery, Showa University School of Medicine
1-5-8 Hatanodai, Shinagawa-ku, Tokyo, 142 JAPAN
